

AGATA WAWRZYŃIAK, RENATA KIERES, ANNA GRONOWSKA-SENGER

OKREŚLENIE *IN VITRO* DZIAŁANIA KWASU ASKORBINOWEGO PRZY INTOKSYKACJI AZOTYNYM SODU

IN VITRO EFFECT OF ASCORBIC ACID ON SODIUM NITRITE INTOXICATION

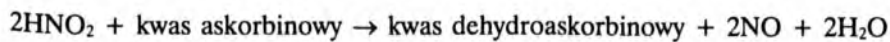
Wydział Żywnienia Człowieka oraz Gospodarstwa Domowego SGGW
02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166
Kierownik: prof. dr hab. A. Gronowska-Senger

W badaniach „in vitro” wykazano znaczący wpływ kwasu askorbinowego na zawartość azotynu sodowego w próbkach w zależności od pH i czasu inkubowania, a także stwierdzono że całkowita ilość witaminy C jako sumy form zredukowanej i utlenionej nie zmienia się pod wpływem azotynu sodowego.

WSTĘP

Wobec wyraźnego zagrożenia zdrowia człowieka żywnością zawierającą substancje obce, coraz większe znaczenie przywiązuje się do kontroli jakości zdrowotnej produktów spożywczych zawierających azotany i azotyny. Problem ten nabiera szczególnego znaczenia nie tylko w aspekcie właściwości kancerogennych czy mutagennych tych związków, ale też i w odniesieniu do możliwości interakcji z innymi biochemicznymi układami ustrojowymi [15]. Azotany i azotyny mogą wywoływać methemoglobinemię, niedokrwistość, rozpad witaminy A i karotenów, zaburzenia czynności tarczycy. [2, 4]. Konieczne jest zatem rozważenie sposobów zmniejszenia narażenia człowieka na ww. związki oraz łagodzenie negatywnych skutków wywołanych ich działaniem. Należałoby przy tym zwrócić szczególną uwagę m.in. na witaminę C [1, 3, 7, 8, 9, 11, 12, 13], która bierze udział w procesach oksydo-redukcyjnych, poprzez utlenienie kwasu askorbinowego do kwasu dehydroaskorbinowego [5, 14].

Mechanizm działania witaminy C jest niezwykle istotny przy ochronie organizmu narażonego na szkodliwe działanie m.in. azotynów, bowiem kwas askorbinowy redukuje azotyny do tlenku azotu sam utleniając się do kwasu dehydroaskorbinowego i zapobiega jednocześnie dalszemu formowaniu się rakotwórczych związków N-nitrozowych przez eliminowanie prekursorów reakcji nitrozowania czyli azotynów [1, 7, 13].



Stąd celowym wydało się podjęcie badań *in vitro* wpływu kwasu askorbinowego na obniżenie toksyczności azotynów.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań wykorzystano treść żołądkową przygotowaną wg instrukcji *Kłyszajko-Stefanowicz* [10] o następującym składzie: płatki owsiane 30 g; NaCl 3 g; α -amylaza 0,1 g; pepsyna 0,1 g; 1N HCL w zależności od pH.

Do 500 cm³ przygotowanej treści żołądkowej (ilość przyjęta w badaniach za średnie wypełnienie żołądka dorosłego człowieka w ciągu jednego posiłku) o zróżnicowanym pH – 1,5; 2,5; 3,5 dodawano kwas askorbinowy na trzech poziomach: 60 mg (zalecana ilość dziennego spożycia dla mężczyzn i kobiet); 120 mg (200% w/w) oraz 180 mg (300% w/w) a także azotyn sodowy w ilości 12 mg, co odpowiada ADI dorosłego człowieka o masie ciała 60 kg.

Do próbek kontrolnych nie dodawano kwasu askorbinowego. Następnie próbki inkubowano w temperaturze 37°C, przez 10, 20, 30, 40, 50 i 60 minut a następnie oznaczano zawartości azotynu sodowego metodą kolorymetryczną wg PN-92/A- 75112, polegającą na pomiarze intensywności zabarwienia jakie dają jony azotynowe z odczynnikiem *Griessa*.

W próbkach z dodatkiem kwasu askorbinowego na poziomie 120 mg i o pH 2,5 (warunki pośrednie doświadczenia) w czasie po 30 i 60 minutach określano spadek zawartości sumy kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego pod wpływem azotynu sodowego. Do próbek kontrolnych w tym doświadczeniu nie dodawano azotynu sodowego. Oznaczanie zawartości witaminy C wykonywano metodą *Tillmansa* z modyfikacją *Pijanowskiego* [6].

W prowadzonych badaniach ze względów praktycznych wszystkie przyjęte ilości (objętość treści żołądkowej, ilość kwasu askorbinowego oraz azotynu sodowego) zostały zmniejszone 10-krotnie.

Wszystkie badania wykonano w trzech seriach analizując każdą z próbek w trzech powtórzeniach.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując test *t-Studenta* do porównania wartości średnich poszczególnych grup. Za statystycznie znamienne różnice przyjęto wartość $p < 0,05$.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

W pierwszym etapie pracy oceniono wpływ zmieniającego się pH (od 1,5 do 3,5) oraz czas inkubowania (od 0 do 60 minut) na zawartość azotynu sodowego w próbach kontrolnych (tab. I).

Stwierdzono, że wraz ze wzrostem kwasowości (obniżającym się pH) oraz przedłużeniem czasu wzrastało tempo spadku ilości azotynu sodowego. Przy pH 1,5 po 1 godzinie odnotowano pozostałość azotynu sodowego na poziomie 79%, natomiast przy pH 2,5 i 3,5 poziom azotynu sodowego nie ulegał tak widocznym w czasie zmianom i obniżył się odpowiednio o 18,9% i 16,4%. Tempo spadku azotynu sodowego w próbach było najwyższe w ciągu pierwszych 20 minut a następnie ulegało spowolnieniu. Przy pH 1,5 w ciągu pierwszych 20 minut poziom azotynu sodowego obniżył się o 10,5%, natomiast w ciągu następnych 40 minut o dodatkowe 9,6%. Przy pH 2,5 w ciągu pierwszych 20 minut nastąpił spadek zawartości azotynu sodowego wynoszący 5,2%, a w czasie od 20 do 60 minut zwiększył się o dodatkowe 13,7%, przy pH 3,5 wartości te wynosiły odpowiednio 4% i 13% (tabela I).

Podsumowując wpływ samego pH na obniżenie zawartości azotynu sodowego w próbach należy podkreślić, że pH wyraźnie oddziaływało na ten proces. Najwyższy spadek był przy pH 1,5, a najniższy przy pH 3,5. Wszystkie różnice były istotne statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

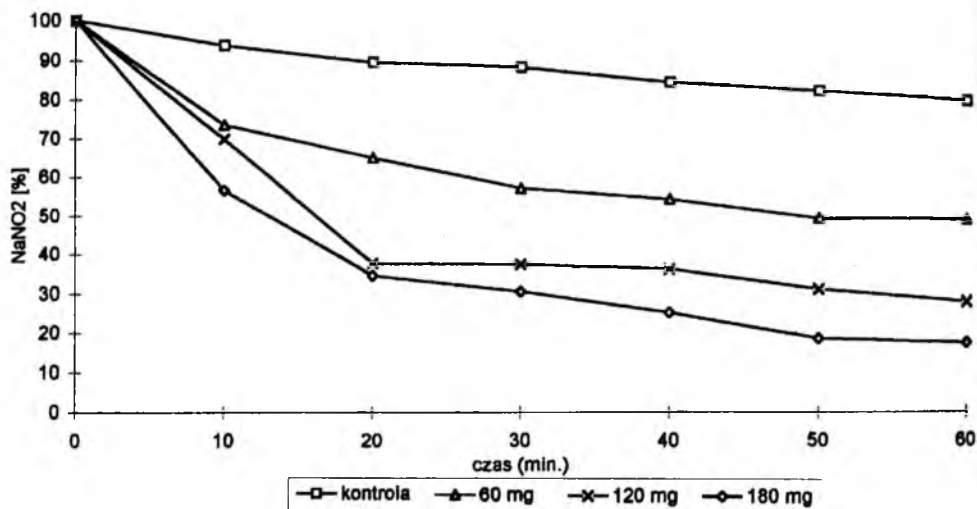
Tabela I. Wpływ kwasu askorbinowego w zależności od czasu inkubowania na zawartość azotynu sodowego w próbach przy pH 1,5 – 3,5.
Effect of ascorbic acid on content of sodium nitrite according to time of incubation at pH 1.5 – 3.5

Czas inkubowania w 37°C (min.)	Kontrola	60 mg	120 mg	180 mg
pH 1.5				
10	11,26 ± 0,10	8,84 ± 0,22	8,39 ± 0,13	6,81 ± 0,16
20	10,74 ± 0,13	7,80 ± 0,18	4,51 ± 0,10	4,14 ± 0,05
30	10,60 ± 0,13	6,86 ± 0,13	4,48 ± 0,08	3,67 ± 0,09
40	10,15 ± 0,05	6,53 ± 0,15	4,33 ± 0,10	3,04 ± 0,08
50	9,88 ± 0,14	5,93 ± 0,20	3,74 ± 0,11	2,34 ± 0,20
60	9,59 ± 0,17	5,91 ± 0,19	3,37 ± 0,08	2,10 ± 0,05
pH 2.5				
10	11,51 ± 0,10	10,87 ± 0,22	10,15 ± 0,10	9,15 ± 0,07
20	11,38 ± 0,05	10,57 ± 0,06	9,82 ± 0,25	8,53 ± 0,14
30	11,15 ± 0,09	10,34 ± 0,05	9,76 ± 0,24	5,96 ± 0,16
40	10,64 ± 0,10	10,09 ± 0,07	9,25 ± 0,20	4,76 ± 0,10
50	10,04 ± 0,10	9,54 ± 0,12	8,51 ± 0,09	4,54 ± 0,06
60	9,73 ± 0,16	9,40 ± 0,05	6,74 ± 0,17	4,49 ± 0,10
pH 3.5				
10	11,85 ± 0,10	11,55 ± 0,06	11,30 ± 0,04	11,09 ± 0,05
20	11,55 ± 0,11	11,23 ± 0,09	10,99 ± 0,07	10,79 ± 0,07
30	11,41 ± 0,10	11,05 ± 0,14	10,75 ± 0,05	10,38 ± 0,08
40	11,33 ± 0,08	10,39 ± 0,12	10,16 ± 0,06	9,96 ± 0,13
50	10,49 ± 0,13	10,16 ± 0,14	9,74 ± 0,16	9,35 ± 0,13
60	10,03 ± 0,15	9,53 ± 0,18	9,35 ± 0,21	8,82 ± 0,21

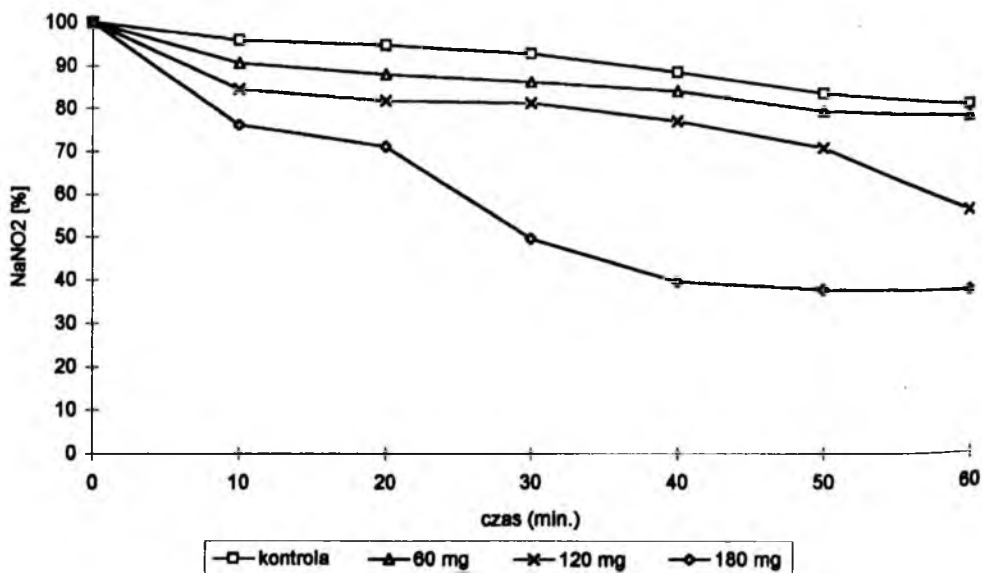
Dawka wyjściowa NaNO₂ 12 mg

W drugim etapie badano, czy dodatek kwasu askorbinowego w ilości 60, 120, 180 mg wpływał na obniżenie zawartości azotynu sodowego dodanego do prób przy różnym pH (ryc. 1, 2, 3).

Stwierdzono, że wraz ze wzrostem dawki kwasu askorbinowego następowało wyższe obniżenie zawartości azotynu sodowego. Zwiększenie dawki kwasu askorbinowego z 60 mg do 180 mg powodowało zwiększenie spadku zawartości azotynu sodowego w próbach odpowiednio od 30,6% do 62,4% (tj. o 31,8%) po godzinie przy pH 1,5.



Ryc. 1. Wpływ kwasu askorbinowego na poziom azotynu sodowego przy pH 1,5.
The effect of ascorbic acid on sodium nitrite content at pH 1,5



Ryc. 2. Wpływ kwasu askorbinowego na poziom azotynu sodowego w próbkach przy pH 2,5
The effect of ascorbic acid on sodium nitrite content at pH 2,5

Natomiast takie samo zwiększenie dawki kwasu askorbinowego przy pH 2,5 i 3,5 powodowało analogiczne zwiększenie spadku zawartości azotynu sodowego wynoszące odpowiednio od 2,7% do 43,6% (tj. o 40,9%) przy pH 2,5 i od 4,2% do 10,1% (tj. o 5,9%) przy pH 3,5 w tym samym czasie. Wszystkie różnice były istotne statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Stwierdzono również najszybsze tempo spadku azotynu sodowego w próbach w ciągu pierwszych 20 minut niezależnie od pH.

Przy pH 1,5 i dawce kwasu askorbinowego 180 mg po 20 minutach następowało obniżenie zawartości azotynu sodowego o 55,0%, natomiast w ciągu następnych 40 minut spadek ten zwiększył się jedynie o dodatkowe 7%. Przy tym samym pH i dawkach kwasu askorbinowego 120 mg i 60 mg po 20 minutach ilość azotynu sodowego zmniejszyła się odpowiednio o 37,5% i 24,5%, natomiast w czasie od 20 do 60 minut spadła o dodatkowe 6,1% dla dawki kwasu askorbinowego dodanego w ilości 60 mg, a dla dawki 120 mg nie zmniejszyła się (rycina 1).

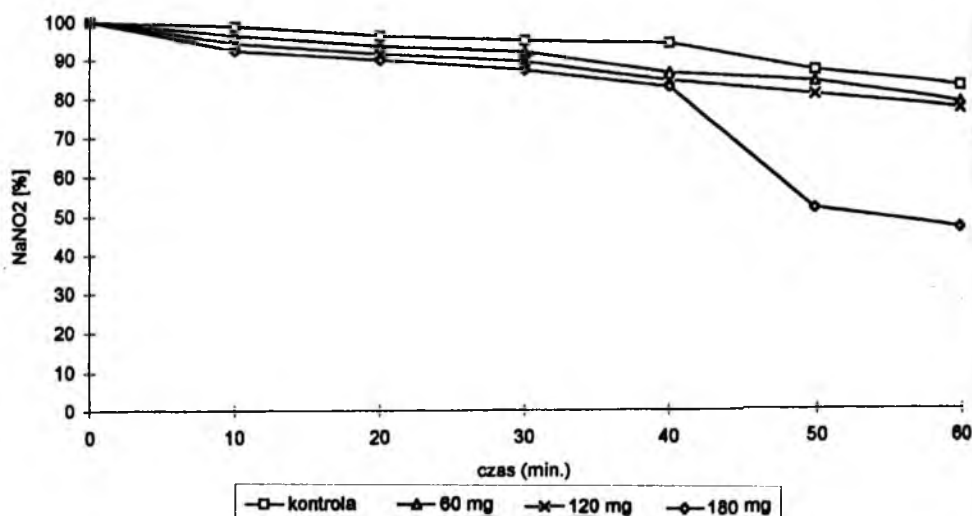
Rozpatrując wpływ kwasu askorbinowego na obniżenie zawartości azotynu sodowego w czasie przy pH 2,5 zaobserwowano podobne tendencje, jak opisano wyżej. Przy dawce kwasu askorbinowego 180 mg spadek zawartości azotynu sodowego był największy i po 20 minutach kształtował się na poziomie 23,7%, a po następnych 40 minutach ilość azotynu sodowego zmniejszyła się dodatkowo o 19%. Przy dawkach kwasu askorbinowego 120 mg i 60 mg zawartość azotynu sodowego spadła po 20 minutach odpowiednio o 13,0% i 6,7%, natomiast w czasie do 1 godziny spadek ten wzrósł dodatkowo o 11,9% przy dawce kwasu askorbinowego 120 mg i obniżył się 4% przy dawce kwasu askorbinowego 60 mg (rycina 2).

Omawiając wpływ kwasu askorbinowego przy pH 3,5 stwierdzono, że średnie spadki zawartości azotynu sodowego są o wiele niższe niż przy pH 1,5 i 2,5. Przy pH 3,5 i najwyższej dawce kwasu askorbinowego 180 mg po 20 minutach obserwowano obniżenie ilości azotynu sodowego jedynie o 6,3%, a w czasie do jednej godziny spadek ten pogłębił się o dodatkowe 4%. Przy tym samym pH i niższych dawkach kwasu askorbinowego 120 mg i 60 mg po 20 minutach zawartość azotynu sodowego spadła odpowiednio o 4,7% i 1,8%, a po następnych 40 minutach spadek ten zwiększył się o 1,0% i 2,4% w zależności od dawki (rycina 3).

Wszystkie omawiane wyniki różniły się statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Rozpatrując tempo spadku zawartości azotynu sodowego przy wybranym pH, a przy różnych dawkach kwasu askorbinowego stwierdzono, że im wyższa dawka, tym skuteczniejsze było działanie kwasu askorbinowego.

Analizując z kolei otrzymane wyniki przy wybranej dawce kwasu askorbinowego i przy różnym pH modelowej treści żołądkowej należy stwierdzić, że przy najwyższej dawce 180 mg, kwas askorbinowy obniżał zawartość azotynu sodowego 3,7-krotnie skuteczniej przy pH 2,5 niż 3,5 oraz 2,3-krotnie skuteczniej przy pH 1,5 niż 2,5. Przy dawce 120 mg kwas askorbinowy działał na obniżenie zawartości azotynu sodowego o 2,7 razy skuteczniej przy pH 2,5 niż przy pH 3,5 oraz o 3 razy skuteczniej przy pH 1,5 niż przy pH 2,5. Przy dawce 60 mg kwas askorbinowy działał na obniżenie zawartości azotynu sodowego o 3,7 razy skuteczniej przy pH 2,5 niż przy 3,5 oraz o 3,6 razy skuteczniej przy pH 1,5 niż przy 2,5. Wszystkie omawiane wyniki różniły się statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.



Ryc. 3. Wpływ kwasu askorbinowego na poziom azotynu sodowego w próbkach przy pH 3,5
The effect of ascorbic acid on sodium nitrite content at pH 3,5.

Wybierając warunki pośrednie doświadczenia (pH 2,5 i 120 mg kwasu askorbinowego) wykazano, że suma witaminy C w formie zredukowanej i utlenionej pozostawała zawsze stała niezależnie od ilości rozłożonego azotynu sodowego w próbach (tab. II). Odzysk w stosunku do ilości kwasu askorbinowego dodanego wynosił średnio 95% (tabela II).

Tabela II. Zawartość witaminy C w próbkach o pH 2,5
The content of vitamin C in samples at pH 2.5

czas (min.)	kontrola		azotyn sodowy 12 mg	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)
30	117,6 ± 0,95	98,0	116,6 ± 2,20	97,1
60	117,3 ± 1,05	97,7	115,9 ± 1,23	96,6

Pomiędzy otrzymanymi wynikami nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Reasumując wyniki i obserwacje uzyskane w niniejszych badaniach można stwierdzić, że kwas askorbinowy wpływał pozytywnie na obniżenie zawartości azotynu sodowego w badanej treści żołądkowej.

WNIOSKI

1. Tempo obniżania się poziomu azotynu sodowego *in vitro* w modelowej treści żołądkowej prób kontrolnych zależne było od pH. Przy pH 1,5 po 1 godzinie odnotowano pozostałość azotynu sodowego na poziomie 79%, natomiast przy pH 3,5 pozostawała

stałość azotynu sodowego nie ulegała tak widocznym w czasie zmianom i po godzinie wynosiła 83%.

2. Szybkość rozkładu azotynu sodowego wzrastała wraz ze wzrostem ilości dodawanego kwasu askorbinowego oraz obniżającym się pH. Maksymalne obniżenie około 60% zawartości azotynu sodowego zaobserwowano przy dawce kwasu askorbinowego 180 mg i przy pH 1,5. Minimalne obniżenie około 1,8% zawartości azotynu sodowego zaobserwowano przy dawce kwasu askorbinowego 60 mg i przy pH 3,5.

3. Tempo spadku zawartości azotynu sodowego w próbkach było na ogół najwyższe w ciągu pierwszych 20 minut, niezależnie od pH i dawki kwasu askorbinowego.

4. Obecność azotynu sodowego nie wpływała na całkowitą zawartość kwasu askorbinowego w próbach, a zmianom ulegały jedynie proporcje pomiędzy formą utlenioną a zredukowaną.

A. Wawrzyniak, R. Kieres, A. Gronowska-Senger

IN VITRO EFFECT OF ASCORBIC ACID ON SODIUM NITRITE INTOXICATION

Summary

The *in vitro* effect of ascorbic acid on the content of sodium nitrite in relation to pH and time of incubation and also effect of sodium nitrite on the total content of vitamin C as a sum of both reduced and oxidized forms was demonstrated.

Ascorbic acid in respective quantities of 60 mg, 120 mg, 180 mg and sodium nitrite in quantity of 12 mg were added to the *in vitro* simulated stomach content at pH 1,5, 2,5, 3,5. The control samples were tested without addition of ascorbic acid.

The Griess method for determination of nitrite and the *Tillmans* method with *Pijanowski's* modification were used for the determination of vitamin C.

It was found that the choice of lower pH significantly decreased the level of nitrite in the control samples produced the disappearance of nitrite increased depending on the quantity of ascorbic acid added to the sample and on pH.

The total content of vitamin C did not change after adding of sodium nitrite to the samples.

The performed studies suggested a positive effect of ascorbic acid decreasing of the nitrite level.

PIŚMIENICTWO

1. Basu T., Weiser T., Dempster J.: An *in vitro* effect of ascorbate on the spontaneous reduction of sodium nitrite concentration in a reaction mixture. *Internat. J. Vit. Nutr.*, 1984, 54, 233. –
2. Borawska M., Omieljaniuk N., Markiewicz R.: Zawartość azotanów, azotynów i witaminy C w jadalnych i odrzucanych częściach wybranych warzyw. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1994, 27, 23. – 3. Duchañ B., Hady S.: Trzy przypadki methemoglobinemii w przebiegu zatrucia azotynami. *Roczn. PZH*, 1992, 43, 267. – 4. Dzieniszewski J.: Żywnienie a niektóre nowotwory przewodu pokarmowego. *Żyw. Człow. Metab.*, 1988, 15, 83. – 5. Gawron A., Zaporowska H.: Ochronne działanie kwasu askorbinowego na hodowlę komórkowe w zatruciu wanadem i chromem. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1987, 20, 228. – 6. Gronowska-Senger A.: Ćwiczenia z analizy żywności. *Wyd. SGGW – AR, Warszawa* 1987, 90. – 7. Haesun-Hwang, Dwyer J., Russell R.: Diet, *Helicobacter pylori* infection, food preservation and gastric risk: are there new reles for preventative factors? *Nutr. Rev.*, 1994, 52, 75. – 8. Izumi K., Cassens R., Greaser M.: Rate constant and activation energy for formation of a nitrosoascorbic acid intermediate compound. *J. Fd Protection*. 1985, 48, 346. – 9. Izumi K., Cassens R., Greaser M.: Reaction of nitrite with ascorbic

acid and its significant role in nitrite-cured food. *Meat Sci.*, 1989, 26, 141. – 10. *Klyszejko-Stepanowicz L.*: Ćwiczenia z biochemii. PWN, Warszawa 1972, 689.

11. *Majchrzak D.*: Wpływ azotanów i azotynów na organizm ludzi i zwierząt. *Żyw. Człow. Metab.*, 1985, 12, 298. – 12. *Moller M., Dahl R., Bockman O.*: A possible role of the dietary fibre product, wheat bran, as a nitrite scavenger. *Fd Chem. Toxic.*, 1988, 26, 841. – 13. *Szponar L., Traczyk I.*: Azotany i azotyny w żywności, racjach pokarmowych i płynach biologicznych. *Żyw. Człow. Metab.*, 1995, 22, 66. – 14. *Wartanowicz M., Ziemiański Ś.*: Rola witaminy C (kwasu askorbinowego) w fizjologicznych i patologicznych procesach ustroju człowieka. *Żyw. Człow. Metab.*, 1992, 19, 193. – 15. *Woźniak J., Pokorska-Lis G., Olędzka R.*: Azotany i azotyny w procesie trawienia tłuszczów i węglowodanów. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1995, 28, 5.

Otrzymano: 1996.06.30